

酶法测定病人分析物浓度用的试剂

技术领域

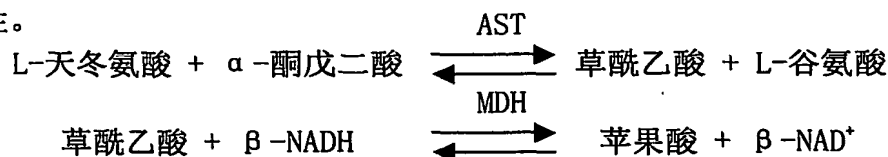
本发明涉及酶法测定病人分析物浓度用的试剂，特别是涉及同存在于样本中的分析物浓度直接相关的反应样本中还原型辅酶氧化的定量测定方法中用的试剂。

背景技术

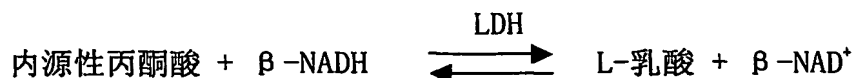
在临床上，应用还原型辅酶 I (β -NADH) 氧化成辅酶 I (β -NAD⁺) 的检测技术测定的分析物包括：天冬氨酸氨基转移酶 (AST)；丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、尿素 (UREA)、乳酸脱氢酶 (LDH-P)、 α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBDH)、氨 (NH₃) 和二氧化碳 (CO₂) 等。

天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 广泛分布于人体，在心、肝、骨骼肌、肾和红细胞内有较高的浓度。这些组织的损伤，如心肌梗塞、病毒性肝炎，肝坏死，肝硬化和营养不良等症均会引起血清或血浆中 AST 水平的升高。

测定 AST 活性时，血清中 AST 催化 α -酮戊二酸和 L-天冬氨酸的氨基转换形成 L-谷氨酸和草酰乙酸。在还原型辅酶 I (β -NADH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 存在下，草酰乙酸被还原为苹果酸，而 β -NADH 被氧化为辅酶 I (β -NAD⁺)，从而引起吸光度下降。这种吸光度的下降的速率与 AST 活性成正比，所以用分光光度法监测在 340nm 处 β -NADH 吸光度下降速率可测定 AST 活性。



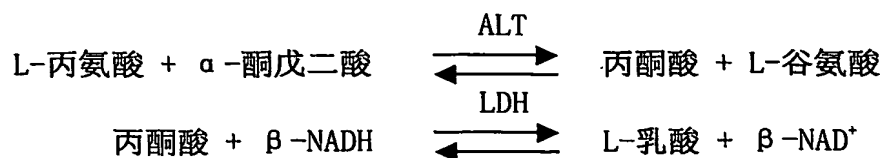
血清中存在的乳酸脱氢酶可使内源性丙酮酸转化为乳酸，同时氧化 β -NADH 而干扰测试，加入高浓度乳酸脱氢酶 (LDH)，可在延迟期内快速消除内源性丙酮酸的干扰。



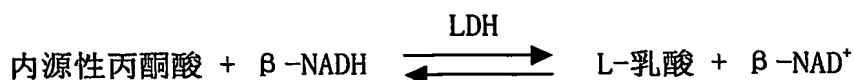
丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 在肝脏中有较高的浓度，而在肾、心、骨骼肌、肺脏中则含有较少。通常 ALT 的升高是由某些与肝脏有关的疾病引起，包括肝硬化、肝癌，病毒性或中毒性肝炎和阻塞性黄疸等。

测定 ALT 活性时，血清中 ALT 催化 α -酮戊二酸和 L-丙氨酸的氨基转换形成 L-谷氨酸和丙酮酸，在 β -NADH 和乳酸脱氢酶 (LDH) 存在下，丙酮酸被还原为 L-乳酸，而 β -NADH 被氧化为 β -NAD⁺，从而引起吸光度下降。这种吸光度的下降速率与 ALT 活性成正比，所以用分光

光度法监测在 340nm 处 β -NADH 吸光度下降速率可测定 ALT 活性。

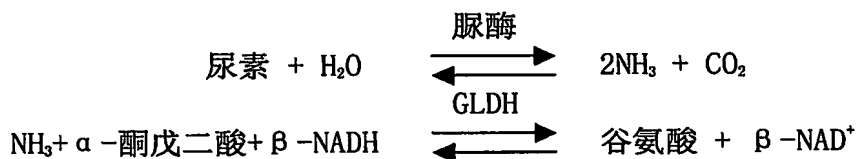


血清中内源性丙酮酸的干扰,可通过加入过量的乳酸脱氢酶(LDH)在延迟期内快速消除。



尿素(UREA)是人体内蛋白质代谢的主要产物,它构成了血液中绝大部分的非蛋白氮,尿素在肝脏内产生并通过肾脏排泄至尿中,各种肾病及泌尿道的梗塞均可引起血液尿素升高,因此血液尿素是肾功能的主要指标。

在测定尿素时,尿素在脲酶的催化下分解为氨和二氧化碳,氨和 α -酮戊二酸在 β -NADH 和谷氨酸脱氢酶(GLDH)存在下形成谷氨酸,同时 β -NADH 被氧化成 β -NAD⁺,从而引起吸光度的下降,在 340nm 处吸光度的下降速率与样品中尿素的含量成正比,所以用分光光度法监测在 340nm 处 β -NADH 吸光度下降速率可测得尿素的含量。



样品中内源性氨干扰在延迟期内即可消除。

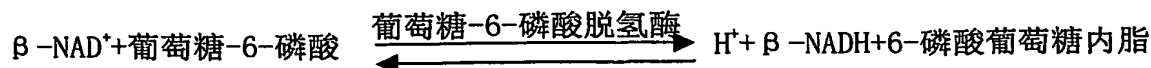


要将 AST、ALT、UREA 检测试剂配制成长期稳定的液体单试剂,关键是解决工具酶和还原型辅酶 I (β -NADH) 的稳定性问题。因为酶是一种结构精细的蛋白质,稳定性极差,温度、pH、离子强度、杂质、金属离子、微生物等均会影响其活性。要提高酶在水溶液中的稳定性,可采用优化环境条件,加入稳定剂和防腐剂等。工具酶应选用含杂酶少、热稳定性好、pH 稳定范围在测试 pH 范围内的酶。工具酶的用量要合适,既要保证其在液体试剂中有相当长的稳定期,又要保证测试结果准确。

保证试剂稳定性的难点主要在于还原型辅酶 I (β -NADH) 的稳定,还原型辅酶 I (β -NADH) 是 AST、ALT、UREA 三种试剂检测的共同指示物。为保证试剂达到应有的线性,试剂中 β -NADH 应保持一定的浓度,即在 340nm 处吸光度不能低于 1.0A。但 β -NADH 在 pH<8.6 的水溶液中是

不稳定的，会自发氧化为 β -NAD⁺，还会受到溶液中各种杂酶的催化，被氧化成 β -NAD⁺。

为了增加 β -NADH 的稳定，早在上世纪 70 年代就有人做了大量研究工作，除了运用一般物理方法如将试剂制成冻干品或干粉，或用无水有机溶剂等增加 NADH 稳定性外，1977 年 Modrovich 在他的专利 (US Patent 4, 394, 449) 中提出了用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) / 葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 把 β -NADH 的不稳定产物 β -NAD⁺ 重新逆向反应生成 β -NADH，起到动态稳定 β -NADH 的目的。



但是由于当时的酶工程还没有发展到今天的水平，根本性的技术问题没有解决，他们只能做成双试剂，合并成液体单试剂的稳定性只有一个月至三个月。90 年 F. Hoffmann La Roche AG (AU-A-61906/90) 运用 Modrivich Ivan E 的原理又做了不少工作，将不稳定产物 β -NAD⁺ 重新变成 β -NADH。但是，他的方法也只能配成双试剂，一旦配成单试剂，稳定性就很差。Klose 等人在专利 US Patent 4, 019, 916 中提出的类似方法的缺点是测试时间长，而且只适用于含有可被磷酸化底物的试剂系统。最有代表性的、与本题关系密切的是澳大利亚 J. 德乔吉奥等于 1996. 2. 26 在中国申请的专利 (CN 1179792A)，它运用非专一性酶/底物对，成功地将动态稳定技术运用到了 AST、ALT 的单试剂和 UREA 的双试剂中，可以将 AST 和 ALT 液体单试剂的稳定性延长到 6-8 月。但是在专利中规定了辅酶还原系统“酶对底物具有不完全的专一性”，“酶/底物对是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶/D-葡萄糖”，虽然 J. 德乔吉奥在前人的基础上，又取得了新的成果。但是使用的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 D-葡萄糖量都很大，酶量为 3500U/L，D-葡萄糖量为 18.016g/L。这样不仅明显增加了试剂的成本，而且还有可能引入新的杂酶。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的上述不足，提出一种酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其中对还原型辅酶的氧化速率进行测定。它并不明显增加试剂的成本，能够防止杂酶引入，具有较好的长期稳定性。

为此，提供了一种酶法测定病人分析物浓度用的试剂，测定时对试剂中还原型辅酶的氧化速率进行测定，所述试剂通过特定酶/底物对的辅酶还原系统在该试剂贮存期间连续再生还原型辅酶的动态稳定作用实现试剂的长期稳定，所述酶和底物对中，酶对底物具有完全的专一性。

所述试剂为液体单试剂；所述辅酶还原系统中酶/底物对优选用葡萄糖脱氢酶/D-葡萄

糖。

本发明还提供了酶法测定病人的天冬氨酸氨基转移酶浓度用的试剂，测定时对试剂中还原型辅酶的氧化速率进行测定，所述试剂通过特定酶/底物对的辅酶还原系统在该试剂贮存期间连续再生还原型辅酶的动态稳定作用实现试剂的长期稳定，该酶对该底物具有完全的专一性并且所述试剂为液体单试剂。所述酶/底物对优选葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖。所述葡萄糖脱氢酶和D-葡萄糖用量分别选用2-100U/L和0.1-20mmol/L，优选5-50U/L和1-10mmol/L。

本发明还提供了酶法测定病人的丙氨酸氨基转移酶浓度用的试剂，测定时对试剂中还原型辅酶的氧化速率进行测定，所述试剂通过特定酶/底物对的辅酶还原系统在该试剂贮存期间连续再生还原型辅酶的动态稳定作用实现试剂的长期稳定，该酶对该底物具有完全的专一性并且所述试剂为液体单试剂。所述酶/底物对优选葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖。所述葡萄糖脱氢酶和D-葡萄糖用量分别选用2-100U/L和0.1-20mmol/L，优选2-50U/L和1-10mmol/L。

本发明还提供了酶法测定病人的血液尿素浓度用的试剂，测定时对试剂中还原型辅酶的氧化速率进行测定，所述试剂通过特定酶/底物对的辅酶还原系统在该试剂贮存期间连续再生还原型辅酶的动态稳定作用实现试剂的长期稳定，该酶对该底物具有完全的专一性并且所述试剂为液体单试剂。所述酶/底物对优选葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖。所述葡萄糖脱氢酶和D-葡萄糖用量分别选用2-100U/L和0.1-20mmol/L，优选5-50U/L和1-10mmol/L。

在用脱氢酶/底物再生还原 β -NADH 系统中，我们选用葡萄糖脱氢酶和它的 100% 专一性底物 D-葡萄糖。D-葡萄糖被氧化为 D-葡萄糖酸内脂， β -NAD⁺ 被还原为 β -NADH。



葡萄糖脱氢酶的 pH 稳定范围为 6-8.5，在试剂测试 PH 7.5-8.2 范围是稳定的。葡萄糖脱氢酶的最适 pH 为 8.0，也在试剂测试 pH7.5-8.2 范围。酶催化反应速率最高，在最适 pH 的 β -NADH 还原系统中，可减少脱氢酶和底物用量，防止引入新的杂酶而影响试剂稳定性，而且几乎不增加试剂成本。

β -NADH 还原再生反应速率，可以用葡萄糖脱氢酶及 D-葡萄糖加入量控制，一般控制再生反应速率与 β -NADH 自然氧化速度相当。这样，葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖的辅酶还原再生系统在试剂贮存时期可连续再生 β -NADH，而在试剂测试时将不会影响测试结果。

用于 β -NADH 还原再生系统的葡萄糖脱氢酶用量选用 2-100U/L，D-葡萄糖浓度选用 0.1-20mmol/L，过高的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖用量会使 β -NADH 还原再生速度过快，在试

剂检测时产生负干扰。

如本说明书的开头中所述，对于用来测定病人 AST 含量的、本发明的试剂除葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖作为辅酶还原系统外，还需要的其他物质有：苹果酸脱氢酶 (MDH)、乳酸脱氢酶 (LDH)、还原型辅酶 I (β -NADH)、L-天冬氨酸和 α -酮戊二酸。

对于用来测定病人 ALT 含量的、本发明的试剂除葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖作为辅酶还原系统外，还需要的其他物质有：乳酸脱氢酶 (LDH)、还原型辅酶 I (β -NADH)、L-丙氨酸和 α -酮戊二酸。

对于用来测定病人 UREA 含量的、本发明的试剂除葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖作为辅酶还原系统外，还需要的其他物质有：脲酶、谷氨酸脱氢酶 (GLDH)、还原型辅酶 I (β -NADH) 和 α -酮戊二酸。

本发明的试剂除了包括测定分析物浓度所需的辅酶还原系统和其它基本底物和酶之外，还可以包括缓冲剂、防腐剂、稳定剂、螯合剂等和具有增强稳定性的功效而实质上不影响本发明的特性的其他成分。

甘油、糖和乙二醇是多羟基化合物，能与蛋白质分子形成很多氢键，并有助于形成“溶剂层”，这种酶分子周围的溶剂层与整体水相不同，它们可增加表面张力和溶液粘度。这类添加剂通过对蛋白质的有效脱水，降低蛋白质水解作用而起稳定酶的作用，因此可以用相对低分子量多元醇稳定酶。我们选用甘油或乙二醇作为酶的稳定剂，过高浓度的甘油使溶液粘度增高，不利于测试。

EDTA 二钠盐与重金属离子形成配位复合物，防止重金属离子对酶活性的抑制。

微生物污染会降低酶的稳定性，加入防腐剂可抑制微生物生长。本发明中优选的防腐剂为叠氮钠。

本发明中，应用葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖稳定 β -NADH 的稳定化技术配制的液体单试剂 AST 基本上包括：

辅酶还原系统（葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖）、L-天冬氨酸、 α -酮戊二酸、苹果酸脱氢酶 (MDH)、乳酸脱氢酶 (LDH)、还原型辅酶 I (β -NADH)。

此外还优选包括：Tris-HCl 缓冲液、氢氧化钾、EDTA 二钠盐、甘油、叠氮钠。

其中 Tris-HCl 缓冲液的浓度选用 20-100mmol/L； α -酮戊二酸浓度选用 6-18mmol/L， α -酮戊二酸在 340nm 有吸收，浓度不宜太高；L-天冬氨酸浓度选用 100-300mmol/L；氢氧化钾的加入是为了帮助 L-天冬氨酸溶解，用量与 L-天冬氨酸为等摩尔；EDTA 二钠盐与金属离子

形成配位复合物,防止重金属离子抑制酶的活性,浓度选用为 1-10mmol/L; β -NADH 的浓度选用 0.1-0.3mmol/L,低于 0.1mmol/L 时 AST 测试时线性范围变小,影响测试结果,高于 0.3mmol/L 会使试剂空白吸光度过高;苹果酸脱氢酶用量选用 100-2500U/L;乳酸脱氢酶的加入可消除样品中内源性丙酮酸的干扰,乳酸脱氢酶用量选用 1000-4000U/L;葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖的加入是使 β -NADH 的不稳定产物 β -NAD⁺重新再生为 β -NADH,以保证试剂中 β -NADH 的相对稳定,葡萄糖脱氢酶用量选用 2-100U/L;D-葡萄糖浓度选用 0.1-20 mmol/l;甘油对酶有稳定作用,用量选用 1%-20%,高浓度甘油会增加溶液粘度;为防止微生物污染,试剂中加入叠氮钠作为防腐剂,用量选用 0.1-1.0g/L。

依本发明配制的一种优选的AST试剂配制如下:

表1

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	80-100	9.69-12.1g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	12-15	2.71-3.39g
L-天冬氨酸	133.1	200-240	26.6-31.9g
氢氧化钾	56.1	200-240	11.2-13.5g
D-葡萄糖	180.2	1-10	0.18-1.8g
甘油	92.1		5%-10%
EDTA. 2Na	372.2	3-5	1.12-1.86g
叠氮钠	65.1		0.3-0.5g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.25-0.28	0.18-0.2g
乳酸脱氢酶			1500-2000U
苹果酸脱氢酶			800-1000U
葡萄糖脱氢酶			5-50U
盐酸	36.5		调 pH 7.8-8.1

本发明中,应用葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖稳定 β -NADH 的稳定化技术配制的液体单试剂 ALT 基本上包括:

辅酶还原系统(葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖)、L-丙氨酸、 α -酮戊二酸、乳酸脱氢酶(LDH)、还原型辅酶 I (β -NADH)。

此外还优选包括: Tris-HCl 缓冲液、EDTA 二钠盐、甘油、叠氮钠。

其中 Tris-HCl 缓冲液浓度选用 20-100mmol/L; α -酮戊二酸浓度选用 8-18mmol/L; L-丙氨酸浓度优选 200-800mmol/L; EDTA 二钠盐选用 1-10mmol/L; β -NADH 用量选用 0.1-0.30mmol/L; 乳酸脱氢酶的用量既要能保证快速消除内源性丙酮酸的干扰, 还要保证催化反应的线性范围, 选用 1000-4000U/L; 葡萄糖脱氢酶用量选用 2-100U/L; D-葡萄糖浓度选用 0.1-20mmol/L, 甘油用量选用 1%-20%, 叠氮钠用量选用 0.1-100g/L.

依本发明配制的一种优选的 ALT 试剂如下:

表2

原料	分子量	浓度 (mmol/L)	每升量
Tris	121.1	80-100	9.69-12.1g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	12-15	2.71-3.39g
L-丙氨酸	89.1	400-500	35.6-44.6g
D-葡萄糖	180.2	1-10	0.72-1.8g
EDTA. 2 钠盐	372.2	3-5	1.12-1.86g
甘油	92.1		5%-10%
叠氮钠	65.1		0.3-0.5g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.25-0.28	0.18-0.2g
乳酸脱氢酶			3000---4000U
葡萄糖脱氢酶			2-50U
盐酸	36.5		调 pH 7.5-7.8

本发明中, 应用葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖稳定 β -NADH 的稳定化技术配制的 UREA 液体单试剂基本上包括:

辅酶还原系统 (葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖)、 α -酮戊二酸、脲酶、谷氨酸脱氢酶 (GLDH)、还原型辅酶 I (β -NADH)。

此外还优选包括: Tris-HCl 缓冲液、ADP 钾盐、甘油、叠氮钠。

其中 Tris-HCl 缓冲液浓度选用 20-150mmol/L; α -酮戊二酸浓度选用 1-15mmol/L; β -NADH 选用 0.1-0.38mmol/L; ADP 钾盐用量选用 0.1-10mmol/L; 脲酶要能快速催化分解尿素, 用量选用 2000-10000U/L; 谷氨酸脱氢酶可控制反应速度, 加入越多, 反应速度越快, 优选 200-2000U/L, 葡萄糖脱氢酶用量选用 2-100U/L; D-葡萄糖用量选用 0.1-20mmol/L; 甘油用量选用 1%-30%; 叠氮钠用量选用 0.1-1.0g/L。

依本发明配制的一种优选的UREA试剂配制如下：

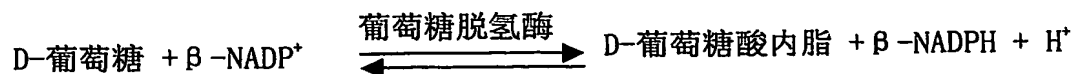
表3

原料	分子量	浓度 (mmol/L)	每升量
Tris	121.1	100-120	12.1-14.5g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	4-8	0.9-1.8g
叠氮钠	65.0		0.2-0.5g
D-葡萄糖	180.2	1-10	0.72-1.8g
甘油	92.1		5%-15%
ADP. K 盐	501.3	1-4	0.5-2.0g
β -NADH, 钠盐	709.4	0.25-0.3	0.18-0.21g
谷氨酸脱氢酶			500-1000U
脲酶			5000-8000U
葡萄糖脱氢酶			5-50U
盐酸	36.5		调 pH 8.0-8.3

在以上液体单试剂中，乳酸脱氢酶应选用对丙酮酸有较高亲和力，不含或仅含微量 ALT、GLDH 等杂酶。苹果酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶选用在水溶液中的稳定性较好的酶。在保证线性测试范围，延迟时间、准确性和稳定性前提下，应尽量减少以上酶的用量，以便减少杂酶的干扰。

可用本发明的试剂测定的分析物除天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、尿素 (UREA) 外还包括：乳酸脱氢酶 (LDH-P)、 α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBDH)、氨 (NH₃) 和二氧化碳 (CO₂) 等。

此外，用葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖也可使还原型辅酶 II (β -NADPH) 的不稳定产物辅酶 II (β -NADP⁺) 重新还原为 β -NADPH。



与现有技术相比，本发明的有益效果是：由于用于稳定试剂以抗氧化的辅酶还原系统使用了高度专一性的酶/底物对，酶和底物的用量大为降低，不仅几乎不增加试剂成本，而且不会因大量稳定酶的加入而引入新的杂酶，从而提高了试剂的稳定性。

最佳实施方式

本发明的各方面详细实施情况将在优选实施例的下述描述中变得更清楚。

实施例 1

如下测定依本发明配制的AST试剂(D-葡萄糖: 5mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 20U/L)的稳定性:

稳定化AST液体单试剂:

表4

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	80	9.69g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	12	2.71g
L-天冬氨酸	133.1	240	31.9g
氢氧化钾	56.1	240	13.5g
D-葡萄糖	180.2	5	0.9g
甘油	92.1		5%
EDTA. 2Na	372.2	5	1.86g
叠氮钠	65.1		0.5g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.27	0.19g
乳酸脱氢酶			2000U
苹果酸脱氢酶			900U
葡萄糖脱氢酶			20U
盐酸	36.5		调 pH 8.0

相应非稳定化AST液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。

其它组份及其浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2-8℃密封存放, 37℃密封存放。

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 15

延迟时间: 60 秒

测试时间: 60 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在质控血清标示值范围内

测试线性: $\geq 550\text{U/L}$

测试结果:

1) AST 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 5

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.788	1.809
1	1.662	
2	1.538	
3	1.415	1.019
4	1.313	
5	1.188	
6	1.148	
7	1.043	

可见, 稳定化 AST 液体单试剂在 37℃可以存放 7 天, 非稳定化 AST 液体单试剂只能存放三天。稳定化单试剂中 β -NADH 稳定性好。

2) AST 液体单试剂 2-8℃存放后空白吸光度

表 6

2-8℃存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 周	1.839	1.809
3 周		1.452
5 周		1.319
7 周		1.210
11 周		1.023
3 个月	1.665	
6 个月	1.477	
9 个月	1.305	
12 个月	1.102	

2-8℃稳定化 AST 液体单试剂中 β -NADH 可以稳定 12 个月以上, 而非稳定化 AST 液体单试剂中 β -NADH 只能稳定 11 周 (不到三个月)。

3) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8℃存放后线性测定

表 7

2-8℃存放 3 个月线性						
理论值 U/L	0	116	233	349	466	582
实测值 U/L	4.8	111	227	349	452	585
2-8℃存放 6 个月线性						
理论值 U/L	0	113	226	338	451	564
实测值 U/L	5.1	115	220	338	436	559
2-8℃存放 9 个月线性						
理论值 U/L	0	105	210	315	420	524
实测值	4.9	106	215	315	406	517
2-8℃存放 13 个月线性						
理论值 U/L	0	122	244	366	488	610
实测值	5.5	124	247	366	473	582

稳定化 AST 液体单试剂在 2-8℃贮存 13 个月，试剂线性测试结果仍然符合要求。

4) 稳定化 AST 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 8

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 30 (20-40)	血清 II (U/L) 靶值 54 (41-67)	血清 III (U/L) 靶值 101 (81-121)
0 天	28	54	98
5 天	28	56	92
6 天	27	52	95
7 天	26	53	95

稳定化 AST 液体单试剂在 37℃存放 7 天，试剂准确度测试结果全部在质控血清标示的靶值范围内。

5) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 9

2-8℃存放时间	血清 I (U/L)	血清 III (U/L)
3 个月	靶值:28 (23-33) 实测值:32	靶值:104 (84-124) 实测值: 117
6 个月	靶值:28 (23-33) 实测值:32	靶值:104 (84-124) 实测值:101

9 个月	靶值:28(23-33) 实测值:30	靶值:104(84-124) 实测值:110
12 个月	靶值:30(20-40) 实测值:32	靶值:101(81-121) 实测值:106

稳定化 AST 液体单试剂在 2-8℃ 存放 12 个月, 试剂准确度测试结果全部在质控血清标示的靶值范围内。

上列数据显示, 该 AST 液体单试剂 2-8℃ 存放 12 个月后或 37℃ 存放 7 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

实施例2

如下测定依本发明配制的AST试剂(D-葡萄糖: 1mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 5U/L)的稳定性:

稳定化AST液体单试剂配方:

表10

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	100	12.1g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	15	3.39g
L-天冬氨酸	133.1	200	26.6g
氢氧化钾	56.1	200	11.2g
D-葡萄糖	180.2	1	0.18g
甘油	92.1		10%
EDTA.2Na	372.2	3	1.12g
叠氮钠	65.1		0.3g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.25	0.18g
乳酸脱氢酶			1500U
苹果酸脱氢酶			800U
葡萄糖脱氢酶			5U
盐酸	36.5		调 pH 8.0

相应非稳定化AST液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。其它组份及其浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2-8℃ 密封存放, 37℃ 密封存放。

测试波长: 340nm

测试温度: 37°C

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 15

延迟时间: 60 秒

测试时间: 60 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在质控血清标示值范围内

测试线性: $\geq 550\text{U/L}$

测试结果:

1) AST液体单试剂37°C存放后空白吸光度

表11

37°C 存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.755	1.745
1	1.624	
2	1.490	
3	1.359	0.943
4	1.245	
5	1.110	

2) AST 液体单试剂 2-8°C 存放后空白吸光度

表 12

2-8°C 存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 周	1.758	1.751
3 周		1.396
5 周		1.258
7 周		1.150
11 周		0.965
3 个月	1.579	
6 个月	1.385	
9 个月	1.208	
12 个月	0.998	

3) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8°C 存放后线性测定

表 13

2-8℃存放 3 个月线性						
理论值 U/L	31	125	250	374	499	624
实测值 U/L	36	127	250	365	497	606
2-8℃存放 6 个月线性						
理论值 U/L	30	122	243	365	486	608
实测值 U/L	33	122	258	365	483	578
2-8℃存放 9 个月线性						
理论值 U/L	30	110	220	330	440	550
实测值	35	118	229	325	436	538

4) 稳定化 AST 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 14

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 30(20-40)	血清 II (U/L) 靶值 54(41-67)	血清 III (U/L) 靶值 101(81-121)
0 天	33	56	107
5 天	35	58	105

5) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 15

2-8℃存放时间	血清 I (U/L)	血清 III (U/L)
3 个月	靶值:30(20-40) 实测值:36	靶值:101(81-121) 实测值:115
6 个月	靶值:30(20-40) 实测值:35	靶值:101(81-121) 实测值:108
9 个月	靶值:30(20-40) 实测值:32	靶值:101(81-121) 实测值:106

上列数据显示, 该 AST 液体单试剂 2-8℃存放 9 个月后或 37℃存放 5 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

实施例 3

如下测定依本发明配制的AST试剂(D-葡萄糖: 10mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 50U/L)的稳定性:

稳定化AST液体单试剂配方:

表16

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	90	10.9g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	13	2.9g
L-天冬氨酸	133.1	220	29.3g
氢氧化钾	56.1	220	12.3g
D-葡萄糖	180.2	10	1.8g
甘油	92.1		7%
EDTA.2Na	372.2	4	1.5g
叠氮钠	65.1		0.4g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.28	0.199g
乳酸脱氢酶			1800U
苹果酸脱氢酶			1000U
葡萄糖脱氢酶			50U
盐酸	36.5		调 pH 8.0

相应非稳定化AST液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。

其它组份及其浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2—8℃密封存放, 37℃密封存放。

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 15

延迟时间: 60 秒

测试时间: 60 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在质控血清标示值范围内

测试线性: $\geq 550\text{U/L}$

测试结果:

1) AST 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 17

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.880	1.886

1	1.759	
2	1.640	
3	1.518	1.075
4	1.396	
5	1.285	
6	1.177	
7	1.080	

2) AST 液体单试剂 2-8℃ 存放后空白吸光度

表 18

2-8℃ 存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 周	1.878	1.883
3 周		1.530
5 周		1.395
7 周		1.283
11 周		1.092
3 个月	1.720	
6 个月	1.541	
9 个月	1.375	
12 个月	1.192	

3) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8℃ 存放后线性测定

表 19

2-8℃ 存放 3 个月线性						
理论值 U/L	0	121.7	244.1	366.0	488.0	600
实测值 U/L	4.5	124	247	366	473	582
2-8℃ 存放 6 个月线性						
理论值 U/L	0	113	226	338	451	564
实测值 U/L	5.0	115	220	338	436	559
2-8℃ 存放 9 个月线性						
理论值 U/L	0	121	222	315	419	548

实测值 U/L	4.6	115	220	315	420	535
2-8℃存放 12 个月线性						
理论值 U/L	0	114	228	343	457	571
实测值 U/L	5.2	114	231	346	449	548

4) 稳定化 AST 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 20

2-8℃存放时间	血清 I (U/L)	血清 III (U/L)
3 个月	靶值:28(23-33) 实测值:31	靶值:104(84-124) 实测值:105
6 个月	靶值:28(23-33) 实测值:29	靶值:104(84-124) 实测值:96
9 个月	靶值:28(23-33) 实测值:29	靶值:104(84-124) 实测值:100
12 个月	靶值:28(23-33) 实测值:28	靶值:104(84-124) 实测值:105

5) 稳定化 AST 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 21

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 30(20-40)	血清 II (U/L) 靶值 54(41-67)	血清 III (U/L) 靶值 101(81-121)
0 天	28	57	100
5 天	30	58	105
6 天	29	56	104
7 天	27	61	102

上列数据显示, 该 AST 液体单试剂 2-8℃存放 12 个月后或 37℃存放 7 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

实施例 4

如下测定依本发明配制的 ALT (D-葡萄糖: 5mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 10U/L) 试剂的稳定性:

稳定化 ALT 液体单试剂:

表 22

原料	分子量	浓度 (mmol/L)	每升量
Tris	121.1	100	12.1g

α -酮戊二酸, Na 盐 ($2H_2O$)	226.1	15	3.39g
L-丙氨酸	89.1	500	44.6g
D-葡萄糖	180.2	5	0.9g
EDTA. 2 钠盐	372.2	5	1.86g
甘油	92.1		5%
叠氮钠	65.1		0.5g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.27	0.19g
乳酸脱氢酶			4000U
葡萄糖脱氢酶			10U
盐酸	36.5		调 pH 7.8

相应的非稳定化ALT液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。

其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2-8℃密封存放, 37℃密封存放。

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 15

延迟时间: 60 秒

测试时间: 60 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在质控血清标示值范围内。

线性: ≥ 550 U/L

测试结果:

1) ALT 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 23

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.857	1.752
1	1.687	1.375
2		1.066
3		
4	1.188	
5	1.057	

可见, 稳定化 ALT 液体单试剂在 37℃ 可以存放 5 天, 非稳定化 ALT 液体单试剂只能存放 2 天。稳定化单试剂中 β -NADH 稳定性较好。

2) ALT 液体单试剂 2-8℃ 存放后空白吸光度

表 24

2-8℃ 存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 周	1.902	1.752
3 个月	1.688	1.235
4 个月		1.041
6 个月	1.468	
9 个月	1.266	
12 个月	1.099	

在 2-8℃ 稳定化 ALT 液体单试剂中 β -NADH 可以稳定 12 个月以上, 而非稳定化单试剂中 β -NADH 只能稳定四个月。

3) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8℃ 存放后线性测定

表 25

2-8℃ 存放 3 个月线性					
理论值 U/L	4.3	153.4	302.5	451.5	600.6
实测值 U/L	4.3	164.0	315.6	477.6	600.6
2-8℃ 存放 6 个月线性					
理论值 U/L	8.5	177.0	345.4	513.9	682.3
实测值 U/L	8.5	199.1	367.9	541.4	682.3
2-8℃ 存放 8 个月线性					
理论值 U/L	6.7	138.1	269.5	400.9	532.3
实测值 U/L	6.7	157.8	293.2	416.5	532.3
2-8℃ 存放 12 个月线性					
理论值 U/L	5.9	154.1	302.3	450.5	598.7
实测值 U/L	5.9	169.3	323.1	471.2	598.7

稳定化 ALT 液体单试剂在 2-8℃ 贮存 12 个月, 试剂线性测试结果仍然符合要求。

4) 稳定化 ALT 液体单试剂 37℃ 存放后准确度测定

表 26

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 23 (18-28)	血清 II (U/L) 靶值 45 (35-55)	血清 III (U/L) 靶值 91 (76-106)
0 天	24.3	42.8	84.5
3 天	22.1	41.8	85.6
5 天	23.8	41.4	82.0

稳定化 ALT 液体单试剂在 37℃存放 5 天, 试剂准确度测试结果全部在质控血清标示的靶值范围内。

5) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 27

2-8℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值:24(19-29)	血清 III (U/L) 靶值:92(77-107)
3 个月	实测值:20	实测值:82
6 个月	实测值:24	实测值:78
9 个月	实测值:23.5	实测值:84
12 个月	实测值:25.5	实测值:88

稳定化 ALT 液体单试剂在 2-8℃存放 12 个月, 试剂准确度测试结果全部在质控血清标示的靶值范围内。

上列数据显示, 该 ALT 液体单试剂 2-8℃存放 12 个月后或 37℃存放 5 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是成功的。

实施例5

如下测定依本发明配制的ALT试剂 (D-葡萄糖: 1mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 2U/L) 的稳定性:

稳定化ALT液体单试剂配方:

表28

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	80	9.69g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	12	2.71g

L-丙氨酸	89.1	400	35.6g
D-葡萄糖	180.2	1	0.18g
EDTA.2 钠盐	372.2	3	1.12g
甘油	92.1		10%
叠氮钠	65.1		0.3g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.25	0.177g
乳酸脱氢酶			3000U
葡萄糖脱氢酶			2U
盐酸	36.5		调 pH 7.8

相应的非稳定化ALT液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统，不含甘油。其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件：2—8℃密封存放，37℃密封存放。

测试波长：340nm

测试温度：37℃

比色杯光径：10mm

样品与试剂体积比：1：15

延迟时间：60 秒

测试时间：60 秒

试剂空白吸光度：反映 β -NADH 的含量，有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度：测定结果应在质控血清标示值范围内。

线性： ≥ 550 U/L

测试结果：

1) ALT 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 29

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.710	1.705
1	1.525	1.330
2		1.019
3		
4	1.016	

2) ALT 液体单试剂 2-8℃存放后空白吸光度

表 30

2-8℃存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 周	1.715	1.713
3 个月	1.488	1.195
4 个月		1.002
6 个月	1.250	
9 个月	1.031	

3) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8℃存放后线性测定

表 31

2-8℃存放 3 个月线性						
理论值 U/L	32	129	257	386	514	643
实测值 U/L	30	128	257	376	507	629
2-8℃存放 6 个月线性						
理论值 U/L	3.9	104	208	312	417	520
实测值 U/L	3.9	117	220	312	404	513
2-8℃存放 9 个月线性						
理论值 U/L	4.6	117	234	351	468	565
实测值 U/L	4.6	112	237	351	459	536

4) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 32

2-8℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 21(13-29)	血清 III (U/L) 靶值 93(73-113)
3 个月	28	90
6 个月	24	91
9 个月	22	86

5) 稳定化 ALT 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 33

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 24(19-29)	血清 II (U/L) 靶值 47(37-57)	血清 III (U/L) 靶值 92(77-107)
0 天	22	51	90

4 天	28	46	87
-----	----	----	----

上列数据显示, 该 ALT 液体单试剂 2—8℃ 存放 9 个月后或 37℃ 存放 4 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是成功的。

实施例 6

如下测定依本发明配制的 ALT 试剂 (D-葡萄糖: 10mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 50U/L) 的稳定性:

稳定化 ALT 液体单试剂配方:

表 34

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	90	10.9g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	13	2.94g
L-丙氨酸	89.1	450	40.1g
D-葡萄糖	180.2	10	1.8g
EDTA.2 钠盐	372.2	4	1.49g
甘油	92.1		7%
叠氮钠	65.1		0.4g
β -NADH 二钠盐	709.4	0.28	0.199g
乳酸脱氢酶			3500U
葡萄糖脱氢酶			50U
盐酸	36.5		调 pH 7.8

相应非稳定化 ALT 液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2—8℃ 密封存放, 37℃ 密封存放。

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 15

延迟时间: 60 秒

测试时间: 60 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在质控血清标示值范围内。

线性: ≥ 550 U/L

测试结果:

1) ALT 液体单试剂 37°C 存放后空白吸光度

表 35

37°C 存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.881	1.875
1	1.715	1.493
2		1.154
3		
4	1.220	
5	1.092	

2) ALT 液体单试剂 2-8°C 存放后空白吸光度

表 36

2-8°C 存放时间	稳定化单试剂	非稳定单化试剂
0 周	1.915	1.880
3 个月	1.697	1.365
4 个月		1.169
6 个月	1.478	
9 个月	1.280	
12 个月	1.115	

3) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8°C 存放后线性测定

表 37

2—8℃存放 3 个月线性						
理论值 U/L	5.1	142	284	425	567	
实测值 U/L	5.1	142	294	412	555	
2—8℃存放 6 个月线性						
理论值 U/L	4.5	125	246	369	492	615
实测值 U/L	4.5	121	244	372	487	604
2—8℃存放 9 个月线性						

理论值 U/L	5.5	80	160	321	481	641
实测值 U/L	5.5	85	170	321	473	625
2-8℃存放 12 个月线性						
理论值 U/L	98	195	293	390	488	580
实测值 U/L	100	199	287	398	479	561

4) 稳定化 ALT 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 38

2-8℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 21(13-29)	血清 III (U/L) 靶值 93(73-113)
3 个月	23	84
6 个月	21	86
9 个月	26	82
12 个月	22	87

5) 稳定化 ALT 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 39

37℃存放时间	血清 I (U/L) 靶值 24(19-29)	血清 II (U/L) 靶值 47(37-57)	血清 III (U/L) 靶值 92(77-107)
0 天	21	45	86
5 天	23	44	84

上列数据显示, 该 ALT 液体单试剂 2-8℃存放 12 个月后或 37℃存放 5 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是成功的。

实施例7

如下测定依本发明配制的UREA试剂 (D-葡萄糖: 5mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 30U/L) 的稳定性:

稳定化UREA液体单试剂:

表40

原料	分子量	浓度 (mmol/L)	每升量
Tris	121.1	100	12.1g

α -酮戊二酸, Na 盐 ($2H_2O$)	226.1	7	1.6g
叠氮钠	65.0		0.3g
D-葡萄糖	180.2	5	0.9g
甘油	92.1		10%
ADP.K 盐	501.3	2	1.0g
β -NADH, 钠盐	709.4	0.28	0.2g
谷氨酸脱氢酶			600U/L
脲酶			6000U/L
葡萄糖脱氢酶			30U/L
盐酸	36.5		调 pH 8.1

相应非稳定化UREA液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。
其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2-8℃密封存放, 37℃密封存放

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 100

延迟时间: 30 秒

测试时间: 60-150 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在标示值范围内

线性: $\geq 50\text{mmol/L}$

测试结果:

1) Urea 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 41

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.821	1.835
1	1.655	1.621
2	1.547	1.424
3	1.421	1.267
4	1.302	1.113
5	1.200	0.956

6	1.126	
7	1.051	

可见, 稳定化 Urea 液体单试剂在 37℃ 可以存放 7 天, 非稳定化 BUN 液体单试剂只能存放 4 天。稳定化单试剂中 β -NADH 稳定性较好。

2) Urea 液体单试剂 2-8℃ 存放后空白吸光度

表 42

2-8℃ 存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 个月	1.773	1.835
3 个月	1.611	1.519
6 个月	1.507	1.271
8 个月		1.035
9 个月	1.391	
12 个月	1.226	
15 个月	1.125	
18 个月	1.029	

在 2-8℃ 稳定化 Urea 液体单试剂中 β -NADH 可以稳定 18 个月以上, 而非稳定化 Urea 液体单试剂中 β -NADH 只能稳定 8 个月。

3) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃ 存放后线性测定

表 43

2-8℃ 存放 4 个月线性						
理论值 (mmol /l)	1.59	10.58	21.16	31.74	42.32	52.90
实测值 (mmol/L)	1.92	11.18	22.21	31.74	43.69	52.89
2-8℃ 存放 6 个月线性						
理论值 (mmol /l)	1.68	14.00	28.00	42.00	56.00	
实测值 (mmol/L)	1.82	14.32	28.09	41.95	54.26	
2-8℃ 存放 9 个月线性						
理论值 (mmol /l)	1.62	13.50	27.00	40.50	54.00	
实测值 (mmol/L)	1.80	14.14	27.55	40.16	52.08	
2-8℃ 存放 12 个月线性						

理论值 (mmol /l)	1.62	13.50	27.00	40.50	54.00
实测值 (mmol/L)	1.74	14.07	27.86	39.67	51.70
2-8℃存放 15 个月线性					
理论值 (mmol /l)	1.62	13.50	27.00	40.50	54.00
实测值 (mmol/L)	1.80	13.39	27.00	38.12	50.15
2-8℃存放 18 个月线性					
理论值 (mmol /l)	1.68	14.00	28.00	42.00	56.00
实测值 (mmol/L)	1.80	14.59	28.44	40.61	53.38

稳定化 Urea 液体单试剂在 2-8℃贮存 18 个月，试剂线性测试结果仍然符合要求。

4) 稳定化 Urea 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 44

37℃存放时间	血清 I (mmol/L) 靶值 3.0 (2.3-3.7)	血清 II (mmol/L) 靶值 10.2 (8.7-11.7)	血清 III (mmol/L) 靶值 18.7 (16.5-20.8)
0 天	3.1	10.4	18.8
5 天	3.12	10.08	19.54
7 天	2.97	10.11	18.77

稳定化 Urea 液体单试剂在 37℃存放 7 天，试剂准确度测试结果全部在质控血清标示的靶值范围内。

5) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 45

2-8℃存放时间	血清 I (mmol/L)	血清 III (mmol/L)
3 个月	靶值 2.5(1.8-3.2) 实测值 2.76	靶值 18.5(16.3-20.7) 实测值 18.06
6 个月	靶值 2.5(1.8-3.2) 实测值 2.52	靶值 18.5(16.3-20.7) 实测值 19.40
9 个月	靶值 2.5(1.8-3.2) 实测值 2.72	靶值 18.5(16.3-20.7) 实测值 19.05
12 个月	靶值 7.70(5.58-9.55) 实测值 7.86	
15 个月	靶值 3.0(2.3-3.7) 实测值 2.83	靶值 18.7(16.5-20.8) 实测值 17.27
18 个月	靶值 3.0(2.3-3.7) 实测值 2.95	靶值 18.7 (16.5-20.8) 实测值 19.05

稳定化 Urea 液体单试剂在 2-8℃存放 12 个月，试剂准确度测试结果全部在血清标示的

靶值范围内。

上列数据显示, Urea 液体单试剂 2—8℃ 存放 18 个月后或 37℃ 存放 7 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

实施例8

如下测定依本发明配制的 UREA 试剂 (D-葡萄糖: 1mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 5U/L) 的稳定性:

稳定化 UREA 液体单试剂配方:

表46

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	110	13.3g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	4	9.04g
叠氮钠	65.0		0.2g
D-葡萄糖	180.2	1	0.18g
甘油	92.1		5%
ADP.K 盐	501.3	1	0.5g
β -NADH, 钠盐	709.4	0.25	0.177g
谷氨酸脱氢酶			500U
脲酶			5000U
葡萄糖脱氢酶			5U
盐酸	36.5		调 pH 8.1

相应非稳定化 UREA 液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。

其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2—8℃ 密封存放, 37℃ 密封存放

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 100

延迟时间: 30 秒

测试时间: 60-150 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在标示值范围内

线性: $\geq 50\text{mmol/L}$

1) Urea 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 47

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.550	1.557
1	1.379	1.345
2	1.265	1.144
3	1.130	0.986
4	1.008	

2) Urea 液体单试剂 2-8℃存放后空白吸光度

表 48

2-8℃存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 个月	1.562	1.555
3 个月	1.393	1.240
6 个月	1.285	0.996
9 个月	1.163	
12 个月	1.001	

3) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃存放后线性测定

表 49

2-8℃存放 3 个月线性					
理论值 (mmol/L)	1.70	12.80	25.60	38.40	51.20
实测值 (mmol/L)	1.80	13.39	27.00	38.12	50.15
2-8℃存放 6 个月线性					
理论值 (mmol/L)	10.50	21.00	31.50	42.00	52.50
实测值 (mmol/L)	11.36	22.11	31.75	41.61	52.29
2-8℃存放 9 个月线性					
理论值 (mmol/L)	10.50	21.00	31.50	42.00	52.50
实测值 (mmol/L)	11.12	21.84	31.61	41.50	50.18
2-8℃存放 12 个月线性					

理论值 (mmol/L)	10.22	20.44	30.66	40.88	51.10
实测值 (mmol/L)	10.80	20.50	29.77	39.14	48.75

4) 稳定化 Urea 液体单试剂 37℃ 存放后准确度测定

表 50

37℃ 存放时间	血清 I (mmol/L) 靶值 2.5 (1.8-3.2)	血清 II (mmol/L) 靶值 9.0(7.5-10.5)	血清 III (mmol/L) 靶值 18.5(16.3-20.7)
0 天	2.67	9.83	18.14
4 天	2.85	9.77	18.50

5) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃ 存放后准确度测定

表 51

2-8℃ 存放时间	血清 I (mmol/L) 靶值 2.7(2.0-3.3)	血清 III (mmol/L) 靶值 18.7(16.5-20.8)
3 个月	2.91	19.20
6 个月	3.00	19.01
9 个月	2.98	18.90
12 个月	2.90	19.00

上列数据显示, 该 Urea 液体单试剂 2—8℃ 存放 12 个月后或 37℃ 存放 4 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

实施例9

如下测定依本发明配制的UREA试剂 (D-葡萄糖: 10mmol/L, 葡萄糖脱氢酶: 50U/L) 的稳定性:

稳定化UREA液体单试剂配方:

表52

原料	分子量	浓度(mmol/L)	每升量
Tris	121.1	120	14.5g
α -酮戊二酸, Na 盐 (2H ₂ O)	226.1	8	2.26g
叠氮钠	65.0		0.5g
D-葡萄糖	180.2	10	1.8g

甘油	92.1		15%
ADP.K 盐	501.3	4	2g
β -NADH, 钠盐	709.4	0.3	0.21g
谷氨酸脱氢酶			1000U
脲酶			8000U
葡萄糖脱氢酶			50U
盐酸	36.5		调 pH 8.1

相应非稳定化UREA液体单试剂中不含葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖辅酶还原系统, 不含甘油。
其它组份浓度与上表相同。

试剂贮存条件: 2—8℃密封存放, 37℃密封存放

测试波长: 340nm

测试温度: 37℃

比色杯光径: 10mm

样品与试剂体积比: 1: 100

延迟时间: 30 秒

测试时间: 60-150 秒

试剂空白吸光度: 反映 β -NADH 的含量, 有效初始吸光度应大于 1.0A

准确度: 测定结果应在标示值范围内

线性: $\geq 50\text{mmol/L}$

1) UREA 液体单试剂 37℃存放后空白吸光度

表 53

37℃存放天数	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0	1.942	1.938
1	1.780	1.723
2	1.675	1.520
3	1.553	1.362
4	1.440	1.205
5	1.341	1.047
6	1.273	
7	1.205	

2) Urea 液体单试剂 2-8℃存放后空白吸光度

表 54

2-8℃存放时间	稳定化单试剂	非稳定化单试剂
0 个月	1.933	1.930
3 个月	1.770	1.613
6 个月	1.669	1.362
8 个月		1.124
9 个月	1.555	
12 个月	1.392	
15 个月	1.295	
18 个月	1.203	

3) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃存放后线性测定

表 55

2-8℃存放 3 个月线性					
理论值 (mmol/L)	11.47	22.93	34.40	45.87	57.34
实测值 (mmol/L)	11.96	23.02	34.40	43.62	55.43
2-8℃存放 6 个月线性					
理论值 (mmol/L)	10.03	20.06	30.09	40.12	50.15
实测值 (mmol/L)	10.03	20.80	31.43	40.12	50.29
2-8℃存放 9 个月线性					
理论值 (mmol/L)	11.30	22.60	34.00	45.30	56.60
实测值 (mmol/L)	11.90	23.20	34.00	43.70	54.20
2-8℃存放 12 个月线性					
理论值 (mmol/L)	11.66	23.31	34.97	46.63	58.29
实测值 (mmol/L)	12.07	24.44	34.97	46.22	56.96
2-8℃存放 15 个月线性					
理论值 (mmol/L)	11.00	21.90	32.90	43.80	54.80
实测值 (mmol/L)	11.80	22.40	31.70	43.80	52.30
2-8℃存放 18 个月线性					
理论值 (mmol/L)	10.27	20.54	30.80	41.07	51.34
实测值 (mmol/L)	11.09	21.73	31.95	41.07	50.81

4) 稳定化 Urea 液体单试剂 37℃存放后准确度测定

表 56

37℃存放时间	血清 I (mmol/L) 靶值 2.5 (1.8-3.2)	血清 II (mmol/L) 靶值 9.0(7.5-10.5)	血清 III (mmol/L) 靶值 18.5(16.3-20.7)
0 天	2.64	9.17	18.64
4 天	2.51	9.70	18.73
7 天	2.47	9.64	19.20

5) 稳定化 Urea 液体单试剂 2-8℃存放后准确度测定

表 57

2-8℃存放时间	血清 I (mmol/L) 靶值 2.7(2.0-3.3)	血清 III (mmol/L) 靶值 18.7(16.5-20.8)
3 个月	2.77	18.35
6 个月	2.80	18.86
9 个月	2.90	18.65
12 个月	2.92	18.60
15 个月	2.98	19.0
18 个月	3.00	18.73

上列数据显示, Urea 液体单试剂 2—8℃存放 18 个月后或 37℃存放 7 天, 试剂测试结果都是正常的。使用高度专一性的葡萄糖脱氢酶和 D-葡萄糖作为稳定 β -NADH 的辅酶还原系统是可行的。

工业实用性

本发明由于用于稳定试剂以抗氧化的辅酶还原系统使用了高度专一性的酶/底物对, 酶和底物的用量大为降低, 不仅几乎不增加试剂成本, 而且不会因大量稳定酶的加入而引入新的杂酶, 从而提高了试剂的稳定性。

权 利 要 求

1、一种酶法测定病人分析物浓度用的试剂，测定时对试剂中还原型辅酶的氧化速率进行测定，所述试剂通过特定酶/底物对的辅酶还原系统，在该试剂贮存期间连续再生还原型辅酶的动态稳定作用实现试剂的长期稳定，其特征在于：所述酶和底物对中，酶对底物具有完全的专一性。

2、根据权利要求1所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述试剂为液体单试剂。

3、根据权利要求1或2所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述酶/底物对是葡萄糖脱氢酶/D-葡萄糖。

4、根据权利要求3所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：其中所述的分析物是天冬氨酸氨基转移酶。

5、根据权利要求4所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为2-100U/L，所述D-葡萄糖用量为0.1-20mmol/L。

6、根据权利要求5所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为5-50U/L，所述D-葡萄糖用量为1-10mmol/L。

7、根据权利要求3所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述分析物是丙氨酸氨基转移酶。

8、根据权利要求7所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为2-100U/L，所述D-葡萄糖用量为0.1-20mmol/L。

9、根据权利要求8所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为2-50U/L，所述D-葡萄糖用量为1-10mmol/L。

10、根据权利要求3所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述分析物是血液尿素。

11、根据权利要求10所述的酶法测定病人分析物浓度用的的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为2-100U/L，所述D-葡萄糖用量为0.1-20mmol/L。

12、根据权利要求11所述的酶法测定病人分析物浓度用的试剂，其特征在于：所述葡萄糖脱氢酶用量为5-50U/L，所述D-葡萄糖用量为1-10mmol/L。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N 9/96 C12Q 1/32 C12Q1/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N 9/96 C12Q 1/32 C12Q1/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI EPODOC CNPAT (测定 试剂 酶 患者 病人 enzyme agent assay)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1179792A(Trac-N) 22..APR 1998(22.04.98) all the document	1-12
Y	CN 1040127C(Trac-N)07.OCT 1998(07.10.98) all the document	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15.JUN.2004(15.06.04)

Date of mailing of the international search report
01 · JUL 2004 (01 · 07 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LILAN

Telephone No. 86-10-62085067



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00749

CN1179792 A	1998-04-22	MX205838 B	2002-01-09
		WO9630503 A1	1996-10-03
		AU4708796 A	1996-10-16
		EP0817841 A1	1998-01-14
		BR9607844 A	1998-07-14
		US5804402 A	1998-09-08
		JP11502410T T	1999-03-02
		AU710552 B	1999-09-23
		MX9707282 A1	1998-06-01
		RU2184778 C2	2002-07-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00749

A. 主题的分类

IPC⁷ C12N 9/96 C12Q 1/32 C12Q1/54

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N 9/96 C12Q 1/32 C12Q1/54

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNKI

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI EPODOC CNPAT (测定 试剂 酶 患者 病人 enzyme agent assay)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
Y	CN, A, 1179792(微量科学有限公司) 1998 年 4 月 22 日 (22.04.98) 全文	1-12
Y	CN, C, 1040127(微量科学有限公司)1998 年 10 月 7 日 (07.10.98) 全文	1-12

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件
 “B” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利
 “L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件
 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
 “X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性
 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性
 “&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期
15. 6 月 2004 (15.06.04)

国际检索报告邮寄日期
01 · 7 月 2004 (01 · 07 · 2004)

国际检索单位名称和邮寄地址
ISA/CN
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)
传真号: 86-10-62019451

受权官员
李岚
电话号码: 86-10-62085067



国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00749

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN1179792 A	1998-04-22	MX205838 B	2002-01-09
		WO9630503 A1	1996-10-03
		AU4708796 A	1996-10-16
		EP0817841 A1	1998-01-14
		BR9607844 A	1998-07-14
		US5804402 A	1998-09-08
		JP11502410T T	1999-03-02
		AU710552 B	1999-09-23
		MX9707282 A1	1998-06-01
		RU2184778 C2	2002-07-10